

博士論文 2018（平成 30）年度

KSHV RTA による免疫抑制関連遺伝子  
プロモーターの活性化に関する研究

慶應義塾大学大学院 薬学研究科

宮澤 雅典

## 論文内容と要約

### 【背景】

カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ; KSHV) はガンマヘルペスウイルスに属する DNA ウイルスである。KSHV は発がんに関与するウイルスとしても知られており、エイズなど免疫低下にともないカポジ肉腫や原発性滲出性リンパ腫を発症させる。KSHV は、他のヒトヘルペスウイルスと同様に潜伏感染と溶解感染という感染形態をとる。潜伏感染はウイルスの複製が起こらず感染状態を保ち、溶解感染はウイルスの複製が起こり細胞を破壊する感染形態である。

KSHV は、ウイルスの DNA 複製、構造タンパク質などウイルスの複製に関するタンパク質をコードするだけでなく、ヒト遺伝子の制御にも関与する。Viral FLICE-inhibitory protein (vFLIP) と viral B-cell lymphoma-2 (vBcl-2) はそれぞれ FLIP と Bcl-2 のホモログであり、KSHV 感染細胞のアポトーシスを抑制する。Viral interferon regulatory factor 1 (vIRF-1) は CBP/p300 と結合することにより IRF3-p300/CBP 複合体形成を阻害し、interferon (IFN) の発現を抑制する。このように KSHV 遺伝子は、アポトーシスやサイトカインシグナルなどに関与するヒトのシグナル伝達を模倣または阻害し、KSHV の生存に有利な環境を構築する。そのうちのひとつである免疫関連分子の発現制御は、ウイルスの持続的な感染に重要である。そこで本研究は、レポータープラスミドを用いて免疫抑制関連遺伝子である *IL-10* プロモーターの活性化メカニズムについて解析した。

IL-10 は抗炎症作用や免疫抑制作用を持つ抑制性サイトカインである。この IL-10 による免疫抑制作用はウイルスの持続的な感染に寄与する。KSHV 関連疾患である原発性滲出性リンパ腫やキャッスルマン病患者では血中の IL-10 濃度が上昇していることが報

告されている。KSHV 感染細胞において IL-10 は免疫抑制に働くだけでなく KSHV 感染細胞の増殖も促進させる。

KSHV replication and transcription activator (KSHV RTA; K-RTA/ORF50) は溶解感染への移行に必須な転写調節タンパク質である。KSHV が溶解感染へと移行する際、K-RTA は最初期遺伝子として発現する。K-RTA は N 末端のロイシンジッパー様ドメインで homo-multimer 構造をとり、塩基性アミノ酸ドメインでプロモーターDNA に直接結合する。C 末端にはトランス活性化ドメインがあり、この部位を欠損させた K-RTA は転写活性化能を持たない。また、K-RTA は KSHV 遺伝子のプロモーターに直接結合するだけでなく、様々な宿主分子を介してプロモーターに結合して転写を活性化させる。

当研究室の先行研究で、K-RTA が *IL-10* プロモーター (*IL-10* の ORF 上流-265 から -1 base) を搭載したレポータープラスミドを活性化することを見出した。本研究では、K-RTA による *IL-10* プロモーターの活性化に関する分子メカニズムの解明を目的とした。

## 【方法】

ルシフェラーゼアッセイ：*IL-10* プロモーターを搭載したレポータープラスミドをトランスフェクションした後、ルシフェラーゼ活性を測定した。内部標準として、CMV プロモーターを搭載した *Renilla* ルシフェラーゼ発現プラスミド (pRL-CMV) をコトランスフェクションした。

分画ウエスタンブロッティング：低浸透圧性溶解バッファーにより細胞質のタンパク質を抽出した。高浸透圧性溶解バッファーを用いて核タンパク質を抽出した。ペレット

は SDS サンプルバッファーで溶解させた。各タンパク質は、anti-Myc antibody、anti- $\alpha$ -tubulin antibody、anti-Topoisomerase II  $\beta$  antibody で検出した。

タンパク質精製：FLAG-K-RTA、SP1-HA、SP3-HA 発現プラスミドをトランスフェクションした。発現させた各種タンパク質をアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

Electrophoresis mobility shift assay (EMSA)：ビオチン標識したプロモーターDNA プロローブを精製タンパク質と混合した。反応溶液を非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動し、ビオチンプロローブを検出した。

Avidin-biotin-coupled DNA (ABCD)アッセイ：細胞抽出液をビオチン標識 *IL-10* プロモーターDNA と混合した。反応液中のビオチン標識 *IL-10* プロモーターDNA をストレプトアビジンビーズで沈降させ、共沈するタンパク質をウエスタンブロッティングにより検出した。

DNase I フットプリントアッセイ： $^{32}\text{P}$  で標識した *IL-10* プロモーターDNA を精製タンパク質と混合した。反応液中の DNA を DNase I で処理し、ポリアクリルアミドゲルで泳動した。泳動したプロモーターDNA の  $^{32}\text{P}$  を検出した。

GST プルダウンアッセイ：大腸菌より GST 融合タンパク質を発現させ、グルタチオンセファロースに結合させた。GST 融合タンパク質に細胞抽出液を混合し、GST 融合タンパク質と共沈するタンパク質をウエスタンブロッティングにより検出した。

## 【結果と考察】

1. K-RTA 上の塩基性アミノ酸領域の機能解析：K-RTA の塩基性アミノ酸領域に変異を導入した変異型 K-RTA K152R、K154R、H145L は野生型と比べ *IL-10* プロモーターの

活性化能が低下した。変異型 K-RTA の DNA 結合能を解析するため、K-RTA が直接結合する PAN プロモーターを用いた EMSA をした。EMSA より、全ての変異型 K-RTA で PAN プロモーターとの結合能が低下していることが明らかになった。さらに分画ウエスタンブロッティングより、変異型 K-RTA は野生型と比べて細胞質分画に多く抽出され、核分画にはほとんど抽出されなかった。以上より、変異型 K-RTA K152R、K154R、H145L は DNA との結合能が低下することにより *IL-10* プロモーターの活性化能が低下することが示唆された。

2. K-RTA と *IL-10* プロモーターとの結合：K-RTA と *IL-10* プロモーターとの直接結合を EMSA で検討した。EMSA より K-RTA は *IL-10* プロモーターとの結合力が非常に弱いことが明らかになった。一方で、細胞抽出液を用いた ABCD アッセイにおいて K-RTA と *IL-10* プロモーターとの結合が検出された。以上より、K-RTA は宿主由来の転写因子を介して *IL-10* プロモーターに結合すると考えた。

3. SP1/3 が K-RTA 依存的 *IL-10* プロモーターの活性化に与える影響：*IL-10* プロモーター上の転写因子結合配列に変異を導入したレポータープラスミドを用いルシフェラーゼアッセイをした。ルシフェラーゼアッセイより、*IL-10* プロモーター上の SP1/3 結合配列に変異を導入することにより K-RTA によるプロモーターの活性化が大きく減少することが明らかになった。ABCD アッセイでも SP1/3 結合配列に変異を導入した *IL-10* プロモーターでは野生型と比べ K-RTA の結合が減少した。そこで SP1 と SP3 に着目し、K-RTA と SP1 および SP3 を共発現させると K-RTA による *IL-10* プロモーターの活性化が増強された。一方で、SP1 および SP3 をノックダウンすると K-RTA による *IL-10* プロモーターの活性化は減少した。以上より、K-RTA による *IL-10* プロモーターの活性化に宿主由来の転写因子 SP1/3 が関与することが示唆された。

4. SP1/3 を介した K-RTA と *IL-10* プロモーターとの結合：GST プルダウンアッセイにより、GST-K-RTA (aa:1-531) と SP1 および SP3 との結合を検出した。精製タンパク質を用いた EMSA により、SP1 および SP3 を介した K-RTA と *IL-10* プロモーターとの結合を検討した。SP1 および SP3 存在下、K-RTA は *IL-10* プロモーターに結合することを明らかにした。DNase I フットプリントアッセイより、SP3 は *IL-10* の ORF 上流 -183/-164 base に結合することを明らかにした。また SP3 存在下 K-RTA は、SP3 と *IL-10* プロモーターとの結合能に影響を与えず、*IL-10* プロモーター上に新たな結合領域も検出されなかった。以上より K-RTA は SP1 および SP3 を足場として *IL-10* プロモーターに結合することを明らかにした。

#### 【結論】

本研究より、K-RTA は宿主由来転写因子 SP1 および SP3 を介して *IL-10* プロモーターに結合することにより *IL-10* プロモーターを活性化させることを示した。

## 論文目録

Masanori Miyazawa, Kohji Noguchi, Mana Kujirai, Kazuhiro Katayama, Satoshi Yamagoe, and Yoshikazu Sugimoto, *IL-10* promoter transactivation by the viral K-RTA protein involves the host-cell transcription factors Specificity Protein 1 and 3, *Journal of Biological Chemistry*, 293 (2), 662-676, 2018.